



Universidade Federal da Paraíba – Campus I
Centro Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Curso de Graduação em Farmácia

WALMA PEREIRA DE VASCONCELOS

**Medida de óxido nítrico por amperometria
induzida pela N-saliciloiltryptamina em
células endoteliais recém dispersas**

João Pessoa – PB

2015

WALMA PEREIRA DE VASCONCELOS

Medida de óxido nítrico por amperometria induzida pela N-saliciloiltryptamina em células endoteliais recém dispersas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora, como parte dos requisitos para a obtenção do diploma de graduação em Farmácia na Universidade Federal da Paraíba.

Orientador:

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

João pessoa – PB
2015

V331mVasconcelos, WalmaPereira de.

Medida de óxido nítrico por amperometria induzida pela N-*saliciloiltryptamina* em células endoteliais recém-dispersas / Walma Pereira de Vasconcelos.- - João Pessoa: [s.n.], 2015.

32f. : il.

Orientador:Robson Cavalcante Veras.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1.Amperometria.2. N-saliciloiltryptamina.3. Óxido nítrico.4. Microsensor.
5. Células endoteliais.



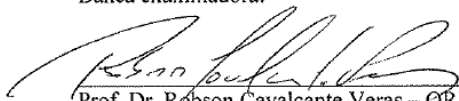
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

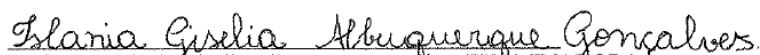


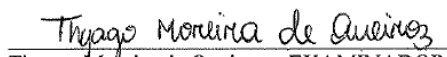
ATA DA SESSÃO DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM FARMÁCIA/CCS/UFPB (TCC) DA GRADUANDA WALMA PEREIRA DE VASCONCELOS

Aos 30 dias do mês de junho do ano de dois mil e quinze às nove horas, no auditório do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB na presença da Comissão Examinadora, constituída pelo Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Araújo e o Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz, compareceu a discente **Walma Pereira de Vasconcelos** para cumprir às exigências regimentais do Curso de Farmácia da UFPB, nível graduação, no que tange a defesa do TCC intitulado "**Medida de óxido nítrico por amperometria em células endoteliais recém dispersas**". Iniciando a sessão, a discente apresentou o trabalho, tendo cumprido a sua apresentação no tempo de 30 (trinta e cinco) minutos. A Comissão Examinadora arguiu a apresentadora e após se dar por satisfeita encerrou a primeira parte da sessão e solicitou a discente que se retirasse por 10 (dez) minutos para que a Comissão Examinadora fizesse a avaliação. A Comissão Examinadora após avaliação do trabalho apresentado pela discente sugeriu as modificações, acréscimos e correções que julgou adequadas e necessárias para a aprovação do trabalho apresentado. As sugestões foram acatadas pela discente que discutirá com o seu orientador e incorporará na versão final do trabalho. Após discussão, a totalidade dos membros da Comissão considerou a candidata **APROVADO (X) – REPROVADO ()**. Nada mais havendo a tratar, a Comissão elaborou a presente ata que, após lida e aprovada, vai assinada por eles e pela discente.

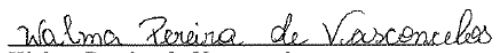
Banca examinadora:


Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras – ORIENTADOR
Universidade Federal da Paraíba – UFPB


Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Araújo – EXAMINADORA
Universidade Federal da Paraíba – UFPB


Thyago Moreira de Queiroz – EXAMINADOR
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Discente:


Walma Pereira de Vasconcelos

Resumo

O endotélio vascular é responsável pela manutenção da homeostasia no sistema cardiovascular por meio do controle da pressão arterial através da liberação de fatores relaxantes e contracturantes derivados do endotélio. Dentre os fatores relaxantes, o óxido nítrico (NO) apresenta uma função primordial no controle do tônus vascular por meio da ativação da via CGs/GMPc que leva ao relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLV). Contudo, um simples fenômeno hemodinâmico pode ser resultante do somatório de outros mecanismos relaxantes derivados do endotélio agindo em conjunto, assim é de grande importância a medida de NO para entendermos o papel desta molécula em diversos processos biológicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi implantar o método de medida de NO por amperometria em células endoteliais (CEs) recém dispersas de aorta de rato e avaliar a quantidade de NO liberado pelo N-saliciloiltriptamina (STP), um derivado de benzoiltriptaminas, onde estudos prévios mostraram que foi capaz de causar vasorrelaxamento dependente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior e este efeito foi relacionado com a participação da via NO/CGs/GMPc. Para isso foram utilizados ratos Wistar (250 – 300 kg) onde a aorta foi removida e imersa numa solução de Hank cujas células endoteliais foram isoladas por meio de uma raspagem mecânica. Uma alíquota da suspensão de CEs foi encaminhada para a citometria de fluxo para o estudo de identificação e viabilidade celular (acima de 75%). Em seguida, foi realizada a calibração dos microsensores utilizando uma solução de CuCl_2 e um doador espontâneo de NO, o SNAP. Finalmente, foram adicionadas concentrações crescentes de STP (1,10 e 100 μM) para a realização da medida de NO por amperometria. Os resultados obtidos na citometria de fluxo foi 90% das células presentes na suspensão estavam viáveis e 79% delas eram CEs. A calibração dos microsensores gerou um gráfico de regressão linear ($R^2 = 0.998756$) indicando que este procedimento produziu uma excelente calibração linear da sonda de NO. Finalmente, o STP foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0.05$) a concentração de NO a partir da suspensão de células endoteliais isoladas da aorta de rato. Portanto, concluímos que esta técnica de medida de NO por amperometria permite detectar quantidades pequenas desta molécula em solução sendo útil em preparações de células isoladas, além da capacidade de avaliar a produção local de óxido nítrico, facilitando a exploração do papel deste mediador em processos fisiológicos ou fisiopatológicos.

Palavras - chave: amperometria, N-saliciloiltriptamina, óxido nítrico, microsensor, células endoteliais.

Abstract

The vascular endothelium is responsible for maintaining homeostasis in the cardiovascular system by controlling blood pressure by releasing relaxing and constrictors endothelium-derived factors. Among the relaxing factors, NO (nitric oxide) presents a major role in the control of vascular tone through activation of the sCG/cGMP leading to the relaxation of VSMC (vascular smooth muscle cell). However, a simple hemodynamic phenomenon may be the result of summation other endothelium-derived relaxing mechanisms acting in concert, it is so great importance to measure NO to understand the role of this molecule in various biological processes. Therefore, the objective of this work was to implement the method of measurement of NO by amperometry at newly scattered endothelial cells of aorta and evaluate the amount of NO released by STP, a derivative of benzoyltryptamines where previous studies have shown that it was capable of causing relaxation endothelium-dependent in mesenteric artery rings and this effect was related to the participation of the NO/sCG/cGMP. The aorta of Wistar rats (250-300 kg) was removed and immersed in Hank's solution whose endothelial cells (ECs) were isolated by means of a mechanical scraping. An aliquot of the ECs of suspension was sent to flow cytometry for the study of identification and cell viability (over 75%). Then, calibration was performed using a microsensors of CuCl₂ solution and a spontaneous NO donor, SNAP. Finally, increasing concentrations were added to STP (1; 10 and 100 µM) for performing the measurement of NO by amperometry. The results of the flow cytometry was 90% of the cells present in the suspension were viable and 79% were ECs. The calibration of microsensors generated a linear regression graph ($R^2 = 0.998756$), indicating that this procedure produced an excellent linear calibration probe NO. Finally the STP was able to significantly increase ($P < 0.05$) the concentration of NO from endothelial cells isolated suspension of aorta. Therefore, we conclude that this measurement of NO by amperometry technique allows to detect small quantities of this molecule in solution is useful in single cell preparations, and the ability to assess the local production of nitric oxide, facilitating the operation of this mediator role in physiological processes or pathophysiological.

Key words: Amperometry, N-salicyloyltryptamine, nitric oxide, microsensors, endothelial cells.

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1. O papel do endotélio e a produção de NO no controle do tônus vascular	9
1.2. Medida de óxido nítrico por Amperometria	12
1.3. Produtos sintéticos bioativos	14
1.4. Triptaminas	14
1.5. N-salicilioiltryptamina (STP)	17
1.6. A importância de novas terapias para o tratamento das doenças cardiovasculares.....	18
3. Metodologia.....	20
3.1. Animais	20
3.2. Avaliação da Produção de NO em Células Endoteliais por Amperometria	20
3.3. Análise Estatística.....	22
4. Resultados	23
5. Discussão	26
7. Referências.....	30

1. Introdução

O controle do sistema cardiovascular envolve diferentes mecanismos e tem como objetivo a manutenção da homeostasia do organismo através do fornecimento de substâncias essenciais para o funcionamento dos tecidos. Assim, a regulação da pressão arterial (PA) é realizada por sistemas que operam momento a momento ou em longo prazo e que dependem de uma integração entre o sistema cardiovascular, renal, neuronal e endócrino (COWLEY, 2006).

Em curto prazo, a pressão arterial é regulada por meio dos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, cujas aferências se projetam para o sistema nervoso central (SNC). O processamento dessas informações produz uma regulação das vias autonômicas eferentes, resultando no controle da distribuição do fluxo sanguíneo em diferentes leitos vasculares. Esse evento leva a um *feedback* negativo em que a pressão arterial elevada provoca reflexivamente a sua diminuição, depressando o barorreflexo, o que resulta no aumento da pressão arterial. No entanto, em níveis normais de pressão, os barorreceptores inibem tonicamente os efeitos simpáticos sobre os vasos sanguíneos e coração (TAYLOR; BISOGNANO, 2010). Já o controle em longo prazo é exercido pela integração do sistema renina-angiotensina-aldosterona com a regulação do volume de líquidos corporais e o equilíbrio hidroeletrólítico (RANG; DALE; RITTER, 2012).

Ainda sobre a pressão arterial, esta corresponde ao produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total onde esta última é influenciada, em graus variáveis, pela atividade de nervos simpáticos vasomotor, pelo nível de hormônios vasoativos circulantes e por fatores locais, incluindo os metabólitos produzidos pela camada endotelial (RIBEIRO et al., 2010).

1.1. O papel do endotélio e a produção de NO no controle do tônus vascular

O endotélio é um órgão endócrino multifuncional, localizado entre o sangue circulante e a parede vascular, onde exerce funções anticoagulante, vasodilatadora e antiinflamatória que são essenciais para a manutenção da homeostasia. O endotélio normal tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas. O controle do tônus da musculatura lisa vascular pelo

endotélio ocorre através da produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDH) e a prostaciclina. Entre os fatores contráteis, os principais são a prostaglandina H_2 (PGH_2), o tromboxano A_2 , a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2013).

O óxido nítrico é um dos fatores mais importantes sintetizado pelas células endoteliais, sendo uma molécula pequena, gasosa, incolor, inorgânica e difusível, com uma meia vida relativamente curta e que é responsável por uma variedade de funções biológicas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Esta molécula foi, inicialmente, descrita por Furchgott como um “Fator Relaxante Derivado do Endotélio - EDRF” ao observar que o endotélio vascular era capaz de produzir um vasodilatador endógeno. Anos mais tarde, em 1987, Ignarro et al. verificou que o EDRF tinha função relaxante idêntica ao NO acompanhado da elevação dos níveis da ciclase de guanilil solúvel (CGc). Assim, a partir destas descobertas foram identificadas as três isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS): neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS), sendo esta última a responsável pela produção de NO nas células endoteliais dos vasos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1986; MONCADA; HIGGS; et al., 1991).

A isoforma da sintase de NO endotelial (eNOS) é um determinante chave da homeostasia vascular e é regulada por diversos receptores de superfície celular. A atividade da eNOS é caracterizada através da ligação da calmodulina ligada ao cálcio ($CAM-Ca^{2+}$) e por alterações na fosforilação pela ação de cinases específicas (RAFIKOV et al., 2011). Além disso, proteínas interagem com eNOS e regulam sua atividade, como a proteína de estresse de 90kDa (hsp90) que age como um modulador de ativação alostérica e promotor do (des)acoplamento da eNOS (ISENOVIĆ et al. 2011). Caveolina-1 é uma proteína de ancoragem de cavéolos que tem demonstrado atenuar as atividades da eNOS, levando a inibição reversível da enzima modulado pela interação $CAM-Ca^{2+}$ (MICHEL; FERON, 1997; VANHOUTTE, 2009). O recrutamento de $CAM-Ca^{2+}$ e hsp90 pode deslocar a caveolina-1 e levar a ativação da eNOS (FULTON et al., 1999) (Figura1).

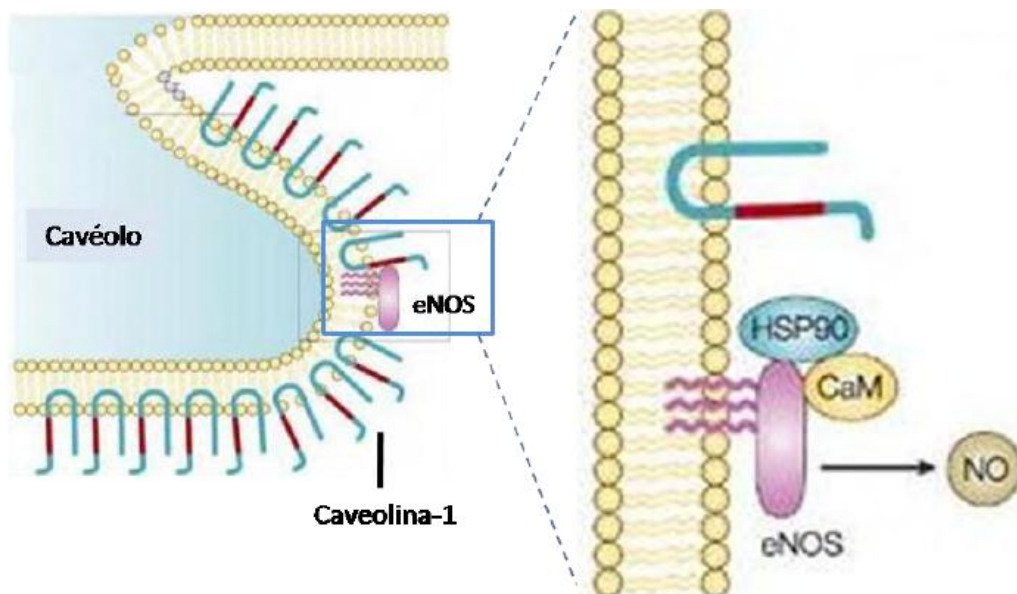


Figura 1: Representação do cavéolo, da caveolina-1 e a interação com a eNOS.

Fonte: (RIBEIRO et al., 2010)

A produção de NO, a partir da conversão enzimática do aminoácido L-arginina, envolve duas etapas: a primeira é uma N-hidroxilação do grupo guanidina da L-arginina formando um intermediário N-hidroxi-L-arginina (L-NOHA) na presença de O_2 e cofatores essenciais como NAD(P)H e (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH_4), na segunda etapa, L-NOHA é metabolizada em L-citrulina e NO como representado no esquema da Figura 2 (RAFIKOV et al., 2011).

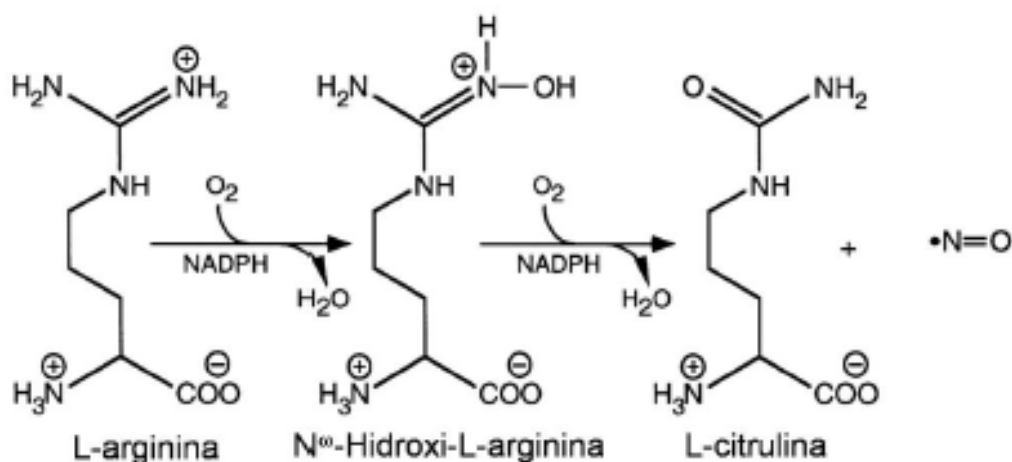


Figura 2: Biossíntese de óxido nítrico.

Fonte: (RAFIKOV et al., 2011)

O NO na sua forma radicalar funciona como um mensageiro parácrino e/ou autócrino que rapidamente se difunde através das membranas das células podendo

reagir com outras moléculas que contenham elétrons desemparelhados, como grupos tióis e heme ligados a íons de ferro (BONAVENTURA et al., 2006; GARTHWAITE et al., 1995; ROY; GARTHWAITE, 2006). Nas células do músculo liso vascular (CMLV), o NO estimula a ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs), um heterodímero que apresenta um grupo heme ao qual se liga o NO, resultando na síntese do segundo mensageiro GMPc e conseqüente ativação da proteína cinase G (PKG) o que promove a abertura dos canais de K^+ e fechamento dos canais de Ca^{2+} . Assim, todos esses eventos levam a diminuição de cálcio intracelular e conseqüente relaxamento (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

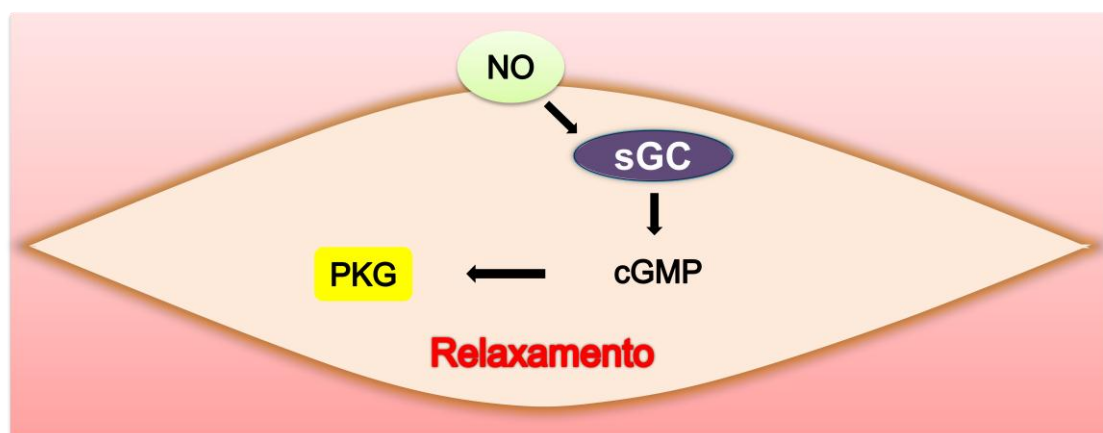


Figura 3: Mecanismo de ação do NO nas células musculares lisas vasculares.

Fonte: (VASCONCELOS, 2015)

1.2. Medida de óxido nítrico por Amperometria

O NO é a principal molécula responsável pelo controle da homeostasia do sistema cardiovascular. No entanto, quando comparado com outros fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), tais como prostaciclina e EDH, o seu papel parece não ser uniforme através do sistema vascular, pois o NO predomina em vasos de larga condutância, enquanto o EDH é aparentemente dominante em vasos de resistência. Mas, diversos dados na literatura demonstram que um desequilíbrio entre a vasoconstrição simpática e o relaxamento promovido pelo NO são decisivos para a manutenção da pressão arterial elevada (ARNAL et al., 1993; PECHÁNOVÁ et al., 2004; ZICHA; DOBESHOVA; KUNES, 2001), na sobrecarga cardíaca por diminuição da capacitância venosa e no aumento da resistência periférica gerada, em parte, pela

disfunção endotelial (BAUER; FUNG, 1996; BREISBLATT et al., 1988; COHN, 1996).

Além disso, um simples fenômeno hemodinâmico pode ser resultante do somatório de um destes mecanismos relaxantes derivados do endotélio agindo em conjunto, além do que diversos vasodilatadores dependentes do endotélio apresentam uma variabilidade na sua ação com vários perfis hemodinâmicos e mecanismos de ação em diferentes leitos vasculares, sendo, portanto essencial a medida de NO para entendermos o papel desta molécula em diversos processos biológicos (PEACH et al., 1987).

No entanto, a medida de NO e seus metabolitos em complexos biológicos é dificultada e tecnicamente exigida devido à concentração relativamente baixa de NO e suas interações complexas com vários outros constituintes (FEELISCH; STAMLER, 1996). Assim, existem inúmeras estratégias para a medida de NO, como técnicas de quimioluminescência usando a reação de NO com azone ou com moléculas tais como lucigenina e luminol/H₂O₂ (ROBINSON; BOLLINGER; BIRKS, 1999), fluorometria usando sondas fluorescentes específicas para NO, espectrofotometria, entre outras. Dentre as varias técnicas para medida de NO, destacamos a amperometria que é um método eletroquímico que utiliza microsensores específicos de NO os quais podem realizar esta detecção tanto em tecidos intactos como em células isoladas (SHIBUKI, 1990). Esse método utiliza a tecnologia da sonda WPI ISO-NO que contém uma membrana polimérica, a qual permite a difusão seletiva de óxido nítrico (NO). Assim, o NO é oxidado e a corrente redox formada, a qual é diretamente proporcional a concentração de NO na solução, é registrada. Esta sonda tem sido usada para demonstrar a produção de NO, principalmente, em células endoteliais (TSUKAHARA; GORDIENKO; GOLIGORSKY, 1993).

Os microsensores de NO estão disponíveis em vários diâmetros e comprimentos de extremidade para uma gama de aplicações. Eles incorporam a propriedade de WPI que é uma tecnologia de combinação de eletrodos em que o composto grafite de sensoriamento de NO e o eletrodo de referência separado são encaixados dentro de um único projeto de sensor (ISO-NO instruction manual).

1.3. Produtos sintéticos bioativos

A química medicinal tem se preocupado com o planejamento racional de novas substâncias bioativas, que envolve a síntese ou a modificação molecular de substâncias, o isolamento ou modificações de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais), a identificação ou elucidação da estrutura, a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica até as suas características estruturais quando da interação dos diferentes sistemas biofase/biológicos e a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E, finalmente, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas entidades de interesse. Esta área de conhecimento, utilizando diferentes estratégias metodológicas complementares, é tradicional e reconhecidamente usada no planejamento de fármacos visando sua aplicabilidade na terapêutica (AMARAL; MONTANARI, 2002).

Nas últimas décadas, alcalóides contendo núcleo indólico, têm recebido muita atenção pelos químicos, farmacologistas e fisiologistas. Este interesse é justificado pela diversidade de atividades farmacológicas, inerentes a substâncias que apresentam em sua estrutura química tal núcleo. Esse fato oferece um amplo universo de perspectivas no que tange a síntese e preparação de análogos sintéticos, com fins de aplicações farmacológicas envolvendo estas substâncias (GUTIERREZ, 2001).

A presença do núcleo indólico em muitas substâncias bioativas confere a estas uma significativa atividade medicinal. Embora tal fato seja importante, relativamente poucos desses agentes têm encontrado uso clínico. Possivelmente o núcleo indólico por si só não confere a uma molécula as propriedades biológicas que estas possuem, sendo a atividade desse grupo mais dependente da natureza de seus substituintes (OLIVEIRA, F. A., 1997).

1.4. Triptaminas

As triptaminas são alcalóides monoamínicos encontrados em plantas, fungos e animais. Apresentam o anel indol em sua estrutura química que é similar ao do aminoácido triptofano (JONES, 1982), sendo essencial para os seres humanos por possuir um amplo papel no equilíbrio fisiológico. Este aminoácido é utilizado para a

síntese protéica e pode ser convertido em compostos que possuem diferentes atividades biológicas (BRODY et al., 2009). Na **Figura 4** encontra-se a estrutura geral das triptaminas, onde a semelhança dos seus efeitos psicofarmacológicos e sua capacidade de produzir tolerância cruzada indica que as indolaminas possuem mecanismos semelhantes, atuando como agonistas 5-HT não seletivos (HALBERSTADT; GEYER, 2011).

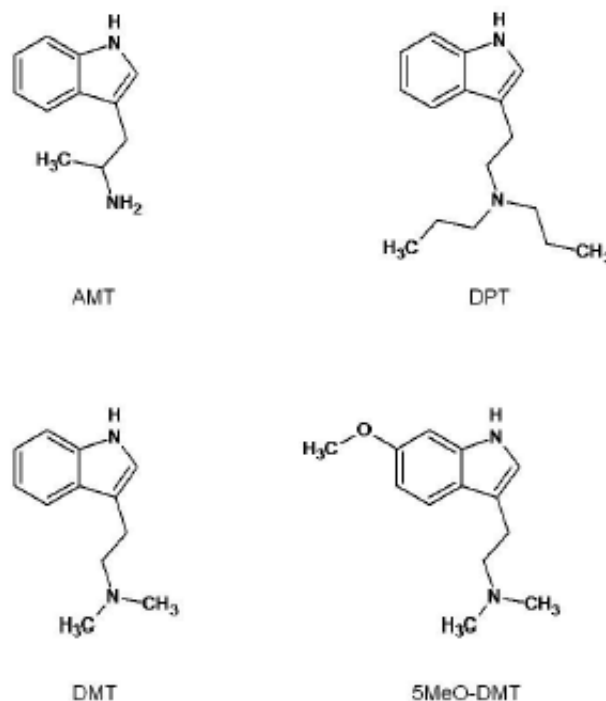


Figura 4: Estrutura geral das triptaminas.

Fonte: (BULCÃO et al., 2012)

Estes alcalóides são derivados do aminoácido triptofano que contém um sistema de anel indólico, originado na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico. Este aminoácido atua ainda como o precursor de uma grande variedade de outros alcalóides além dos indólicos, podendo sofrer rearranjos que promovem a conversão do sistema de anel indólico em quinolínic (DEWICK, 2002). Assim, a triptamina e os seus derivados, N-metil e N,N-dimetil, são formados por uma modificação simples do L-triptofano através de uma reação catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AACD) que logo em seguida sofre a ação da indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) em que grupamentos metil da S-adenosilmetionina são transferidos para a triptamina, gerando inicialmente N-metiltryptamina (NMT) e em seguida N,N-dimetiltryptamina (DMT) (JACOB; PRESTI, 2005). No entanto, a maior

parte do L-triptofano é metabolizado pela via das quinureninas originando a quinurenina e pela via serotoninérgica levando a formação de serotonina (**Figura 5**) (FONTANILLA et al., 2009).

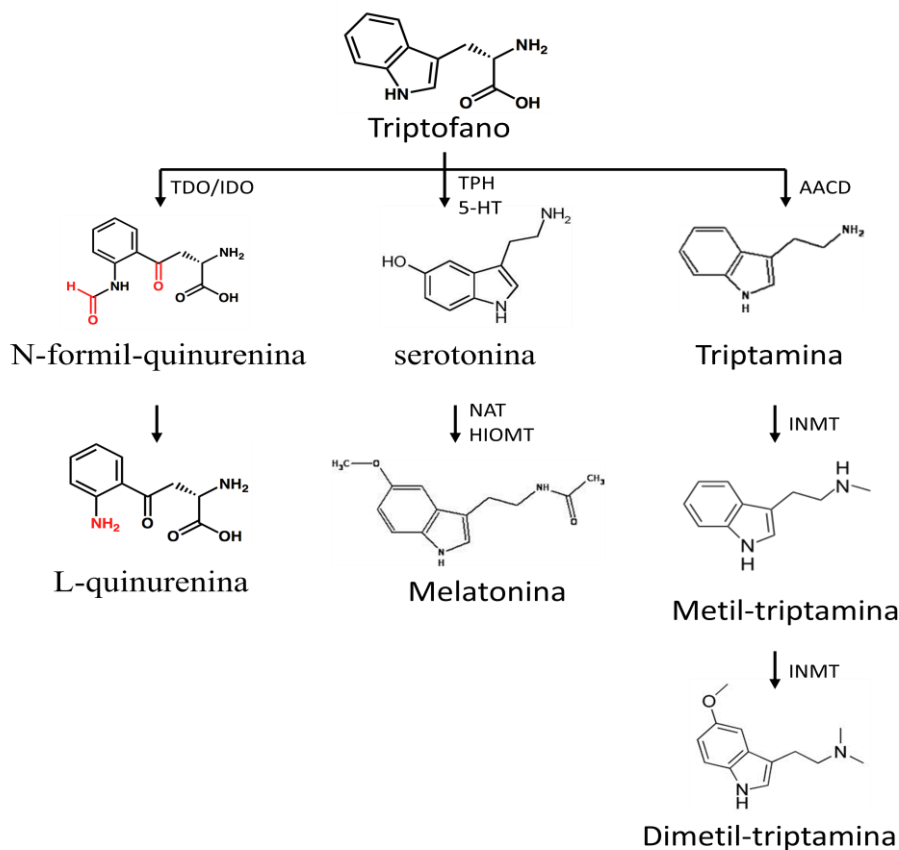


Figura 5: As várias vias de metabolização do triptofano.

Fonte: (COIMBRA, 2012)

Os derivados da triptamina, principalmente a 5-metoxi- α -metiltriptamina (5-MeO-AMT), inibem fortemente a recaptação e aumentam a liberação das monoaminas. Já a N,N-dipropil-triptamina (DPT), a 5-MeO-DIPT, a 5-MeO-MIPT e a 5-metoxi-N,N-dimetil-triptamina (5-MeO-DMT) inibem apenas a recaptação das monoaminas. A N,N-dimetil-triptamina (DMT) é um composto tipicamente psicoativo (agonista serotoninérgico) derivado da triptamina que existe em milhares de espécies de plantas. Existem compostos estruturalmente relacionados, como a 5-MeO-DMT, bufotenina, psilocibina e psilocina, os quais são também produtos naturais (DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION 2003).

Estas substâncias que apresentam o anel indólico em suas estruturas são responsáveis por diversos processos de sinalização celular. Em mamíferos, por exemplo, as triptaminas endógenas foram as primeiras reconhecidas por exercer atividades neuromodulatórias e neurotransmissoras, as quais envolvem o controle da homeostasia metabólica cerebral, da regulação do ritmo circadiano e da modulação na sinalização excitatória (JONES, 1982).

Baseado nesta variedade de efeitos biológicos tem sido cada vez maior o interesse pelos derivados triptamínicos, em especial, a N-saliciloiltriptamina, um análogo da benziltriptamina, o qual demonstrou agir como um agente anticonvulsivante exercendo efeitos neuroprotetores por melhorar a capacidade das células neuronais em gerar o potencial de ação. Foi observado também que o STP exerce uma atividade antinociceptiva, a qual foi sugerida estar associada à modulação da via inflamatória (QUINTANS et al., 2010).

1.5. N-saliciloiltriptamina (STP)

A benzoiltriptamina é uma amida natural que tem um núcleo indólico, ela foi isolada pela primeira vez de *Myrtopsis myrtoidea*, (pertencente à família Rutaceae) (HIFNAWY et al., 1977). Posteriormente um derivado com estrutura química semelhante foi sintetizado, a N-saliciloiltriptamina, STP. Testes realizados com este derivado, até a dose de 400mg/Kg (via i.p.), não provocaram mortalidade em camundongos num período de 48 horas de observação. Este resultado indica que a STP tem baixa toxicidade (OLIVEIRA, F. A., 1997). O STP protegeu, de forma significativa, convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (TRAPANI et al., 1996), em camundongos (30%) e protegeu ainda as convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular agudo (50%), sugerindo uma possível atividade depressora do SNC em camundongos (OLIVEIRA, F.A. et al., 2001).

Recentes estudos moleculares realizados através da linhagem celular neuroendócrina, GH₃, utilizando a técnica de "patch clamp", mostraram que a STP foi capaz de diminuir as correntes de K⁺ dependentes de voltagem, porém aumentou significativamente a atividade dos canais de K⁺ de alta condutância (maxi-K). Este estudo também mostrou a redução da amplitude das correntes de Ca²⁺ do tipo L

(ARAÚJO et al., 2003). Assim, estes relatos ressaltam que a STP tem ótimas perspectivas medicamentosas.

1.6. A importância de novas terapias para o tratamento das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCs) constituem um grave problema de saúde pública, pois correspondem a cerca de 30% de todas as mortes ocorridas mundialmente, com cerca de 80% destas ocorrendo em países em desenvolvimento (GAZIANO, 2005). No Brasil, segundo a V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2006), em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares. A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral, cujo fator de risco principal é a hipertensão (OLMOS; LOTUFO, 2002).

É estimado que aproximadamente um bilhão de indivíduos no mundo são atingidos pela hipertensão, a qual se constitui como uma das condições clínicas mais comuns associadas ao aumento do risco cardiovascular, incluindo infarto do miocárdio e falência cardíaca (PSATY et al., 2003).

Segundo o Ministério da Saúde, é evidente o aumento significativo do número de casos de doenças arteriais coronarianas (DAC) nas últimas cinco décadas (LIMA; MOREIRA; SODRÉ, 1999). Estima-se em 15 a 20% a prevalência de pacientes portadores de hipertensão arterial na maioria das sociedades afluentes do planeta, inclusive no Brasil (DUNCAN, 1993; FUCHS, 1994). Assim, a procura de novas estratégias para reduzir a pressão arterial com a finalidade de causar impacto benéfico para a saúde pública (FERRONI et al., 2006) e os ensaios de novas moléculas, que revelarão sua potencialidade terapêutica, se faz necessária nos dias atuais.

2. Objetivos

2.1. Geral

Implantar a técnica de medida de óxido nítrico por amperometria em células endoteliais recém dispersas com o intuito de avaliar a produção de óxido nítrico induzida pela N-saliciloiltryptamina.

2.2. Específicos

- Padronização da técnica de amperometria utilizando uma suspensão de células endoteliais recém dispersas de ratos normotensos,
- Avaliar a produção de óxido nítrico pela N-saliciloiltryptamina utilizando o método de amperometria.

3. Metodologia

Para realização deste estudo, foram empregadas metodologias *in vitro*, desenvolvidas no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Núcleo de Pesquisas do IPeFarm/UFPB.

3.1. Animais

Para a realização de todos os experimentos foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, pesando entre 250-300 g, sendo todos provenientes do Biotério “Prof. George Thomas” do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Estes animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e pressão, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração, conforme recomendações internacionais (Wolfensohn e Lloyd, 2003).

Antes da realização dos protocolos experimentais, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFPB, sob o número CEUA N°1001/14.

3.2. Avaliação da Produção de NO em Células Endoteliais por Amperometria

Os animais foram sacrificados por anestesia (cetamina + xilazina 80mg + 4mg/kg) seguida por exsanguinação, seguindo as normas de cuidados com animais aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, com secção dos vasos cervicais. Em seguida, a aorta torácica foi removida e logo imersa em solução de Hank (Composição em M: NaCl, 8,0; KCl, 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,204; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1; CaCl_2 , 0,1855; KH_2PO_4 , 0,06; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0475; NaHCO_3 , 0,35; and glicose, 1,0), onde foi liberta do tecido conjuntivo e adiposo adjacente. Em seguida, foi aberta longitudinalmente e as células endoteliais foram coletadas através de uma raspagem mecânica. (SFB)(NING et al., 2012; VAN BEIJNUM et al., 2008a).

Uma alíquota foi encaminhada para a identificação e viabilidade celular através de citometria de fluxo. As células foram incubadas com $1\mu\text{g}/10^6$ células/ml de anticorpo “anti-CD 31rat endothelium” – PE- (OX43, sc53109 da Santa Cruz, EUA) durante 45 minutos a 4°C na ausência de luz. Em seguida, um citômetro FACS Canto II equipado com laser de argônio (λ_{ex} : 488nm) foi utilizado para quantificar a fluorescência celular. Em cada amostra foram analisadas 10000 células onde partículas não celulares foram

removidas da análise pela realização de “gates” e a presença da população marcada (CD-31) confirmou a origem endotelial (VAN BEIJNUM et al., 2008b). A viabilidade foi obtida com o uso da sonda 7-AAD o qual age nas células “perfuradas”.

Após a confirmação da identidade celular e viabilidade celular acima de 75%, logo em seguida foi obtida a medida de NO liberado pelas células, na qual foram usados microsensores eletroquímicos para medida da liberação de óxido nítrico por amperometria (MALINSKI; TAHA, 1992). Inicialmente os microsensores (ISSO-NOP3005, WPI, EUA) foram conectados a um amplificador (TBR 4100 – Free Radical Analyser, WPI, FL, EUA) e este a um Bridge (LAB-TRAX com 4 canais, WPI, FL, EUA) o qual realiza a interface com um computador contendo o software DataTrax-2 (WPI, FL, EUA). Os microsensores foram mantidos imersos por duas horas na solução de CuCl_2 (0,1M) para que polarizassem e se mantivessem a uma amperagem estável com faixa de aceitabilidade entre 150-3500 pA. Os microsensores foram calibrados por decomposição do SNAP (*S*-nitroso-*N*-acetil-D,L-penicillinamina) usando solução de CuCl_2 (0,1M), como catalisador (SERPE; ZHANG, 2007). A curva-padrão foi construída pela plotagem da amperagem vs concentração de NO liberado pelo SNAP. Esta medida se dá através da captação de uma corrente redox gerada a partir da oxidação do NO e captada por eletrodos. Esta reação eletroquímica é uma transferência de um elétron da molécula de óxido nítrico para o eletrodo resultando na formação do cátion nitrosônio (NO^+) (SERPE; ZHANG, 2007). A reação redox descrita gera pulsos de corrente muito pequenas que são captadas e amplificadas, e as informações são tratadas por um sistema de aquisição de dados.



Figura 6: Equipamento utilizado para a medida de NO.
Foto: (VASCONCELOS, 2015)

3.3. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As medias foram avaliadas por análise de variância “one-way” ANOVA seguido de teste de Dunnett, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados com diferença significativa.

4. Resultados

4.1. Avaliação da viabilidade e identificação de células endoteliais por citometria de fluxo

Para avaliar a viabilidade e identificar as células endoteliais (CEs) isoladas da aorta dos animais foi utilizada a citometria de fluxo. As figuras A, B e C representam o controle negativo, no qual foi utilizado o anticorpo inespecífico IgG (C), e as imagens D, E e F representando as células marcadas, tanto com o 7-AAD (E) como também com o CD-31⁺. Nas células contendo o anticorpo IgG não foi observada a emissão de fluorescência o que demonstra que o mesmo não foi capaz de estabelecer ligação com as células presentes na suspensão. Em contrapartida, 90% das células incubadas com a sonda 7-AAD apresentaram-se viáveis visto que esta sonda se liga as células perfuradas indicando as células não viáveis. Já as células marcadas com o anticorpo CD-31⁺, 79% foi capaz de emitir fluorescência, ou seja, de formar ligação com este anticorpo o qual é específico para CEs. Assim, 90% das células na suspensão estavam viáveis e 79% delas eram células endoteliais.

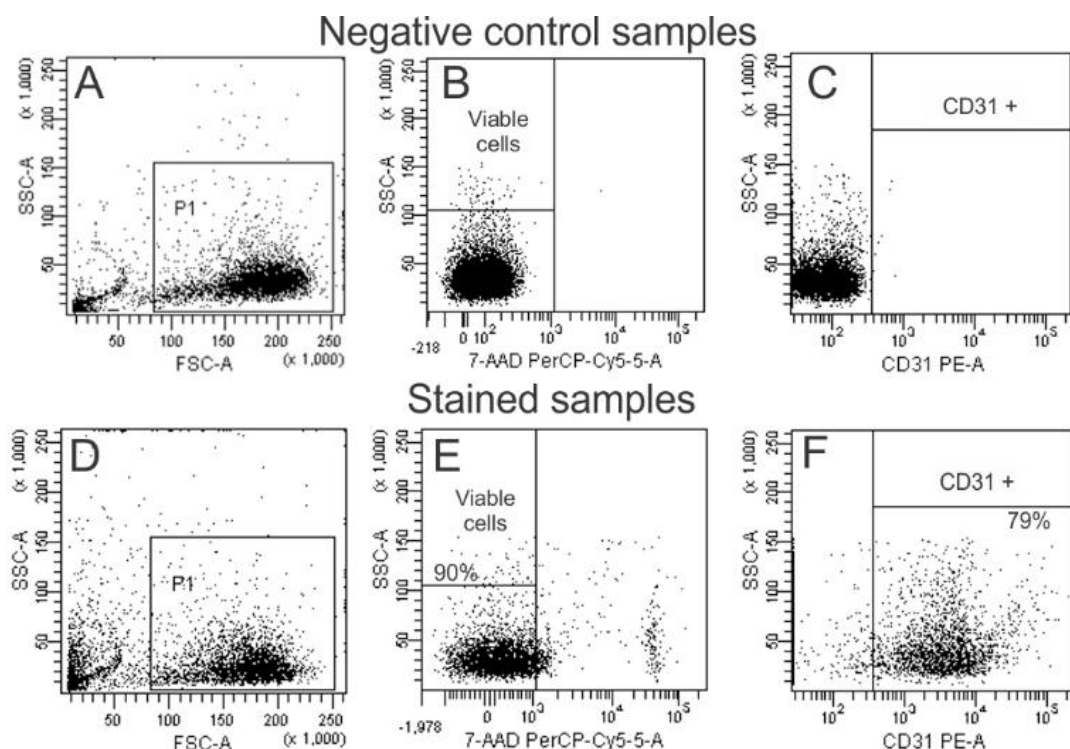


Figura 6: Fluorescência por citometria de fluxo em suspensão de células endoteliais isoladas de aorta de ratos. Os painéis superiores (A, B e C) representam o controle negativo, na presença do anticorpo IgG (C). Os painéis inferiores (D, E e F) representam as células marcadas com a sonda 7-AAD e o CD-31⁺ (respectivamente, E e F).

4.2. Construção da curva de calibração dos microsensores de NO

A curva de calibração foi obtida adicionando as concentrações de 0,0188 μM ; 0,03771 μM ; 0,0941 μM ; 0,1874 μM e 0,3719 μM da solução padrão de SNAP, a partir da qual foi gerada uma análise de regressão linear que exibiu a equação da reta e o coeficiente R^2 , indicando que este procedimento produziu uma excelente calibração linear da sonda de NO, como mostra a **Figura 7**.

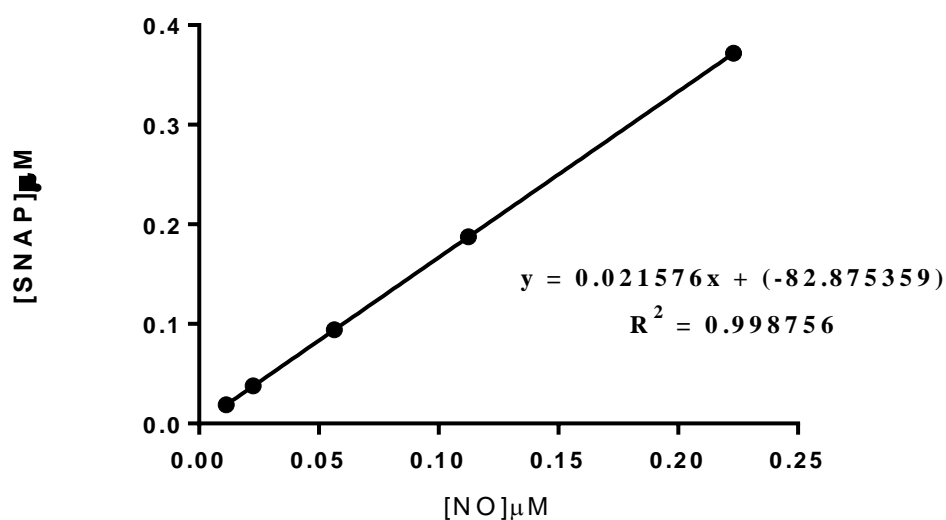


Figura 7: Reta de regressão linear para calibração dos microsensores de NO.

4.3. Produção de NO pela N-saliciloltriptamina em células endoteliais

A **Figura 8** representa a concentração de NO frente às varias concentrações crescentes da N-saliciloltriptamina. Como podemos observar, o STP (10 e 100 μM) foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0.05$) a concentração de NO a partir da suspensão de células endoteliais isoladas da aorta de rato.

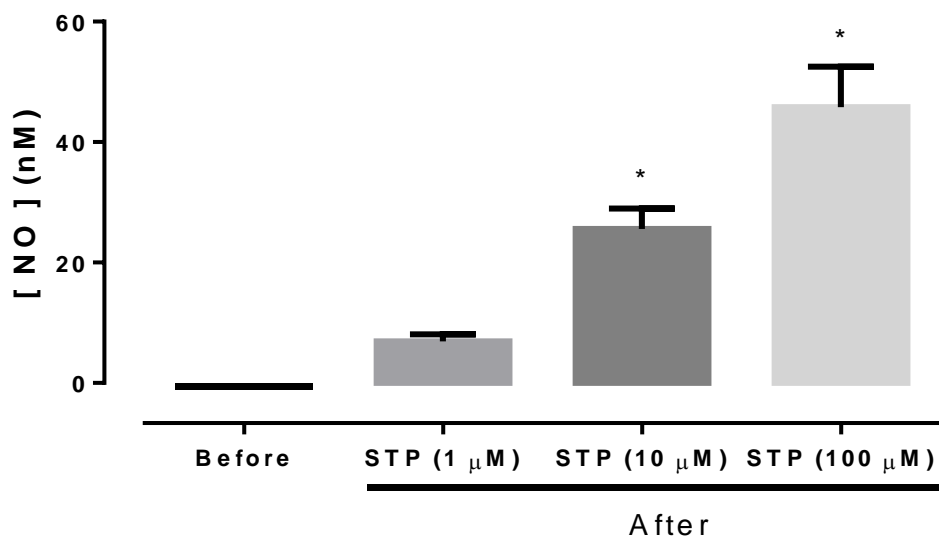


Figura 8: Medida amperométrica de NO. Representação gráfica da [NO] antes e depois de adicionar o STP (1; 10 e 100 μM) em suspensão de células endoteliais isoladas de aortas de ratos.

5. Discussão

Os vasodilatadores têm ação direta sobre as paredes dos vasos sanguíneos por meio da estimulação de fatores relaxantes endógenos ou pela inibição na liberação de fatores contracturantes, que agem nas células musculares lisas vasculares levando a diminuição da pressão arterial. Dentre os fatores relaxantes, o NO tem um importante papel no controle do tônus vascular e sua produção pode ser estimulada tanto por agonistas endógenos quanto exógenos (MONCADA; PALMER; et al., 1991).

Assim, as propriedades farmacológicas dos derivados de triptamina tem sido o alvo para o desenvolvimento de novas terapias. Dentre estes derivados, estudos prévios mostraram a ação do STP em alguns sistemas biológicos demonstrando o envolvimento de canais iônicos influenciando a excitabilidade neuronal e a modulação de respostas inflamatórias e de dor (ARAÚJO et al., 2003; GASPAROTTO et al., 2013; QUINTANS et al., 2010). No sistema cardiovascular, estudos de reatividade vascular mostrou que o STP foi capaz de induzir um vasorelaxamento dependente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior de ratos cujo efeito foi atenuado na presença de L-NAME (inibidor da eNOS) e, portanto, atribuído a participação da via NO/CGs/GMPc (VERAS, 2005). No entanto, até o momento não há estudos mostrando detecção molecular de NO em células endoteliais estimuladas por STP.

Existem inúmeros métodos para a detecção de NO como experimentos com oxihemoglobina, ressonância paramagnética de elétrons, quimioluminescência, HPLC, reação de Griess ou por diferentes eletrodos eletroquímicos e, além disso, é possível medir NO indiretamente via seu segundo mensageiro, GMPc. Neste contexto, a amperometria é uma técnica utilizada para a medida direta de NO em solução por meio de um microsensor específico para este composto. Uma grande vantagem deste método é que o total de NO liberado pelas células podem ser medidos rapidamente antes de ser oxidado em nitrato/nitrito o qual não será detectado pela sonda (GADI et al., 2009).

A calibração dos microsensors de NO foi realizada por meio da decomposição do SNAP em solução de cobre, cuja taxa de decomposição é lenta e a cinética de decomposição é dependente de vários parâmetros como pH, presença de catalisadores, temperatura e luminosidade. Neste estudo, o SNAP foi utilizado em combinação com o cloreto cúprico (CuCl_2), o qual funcionou como catalisador da reação, para geração de

uma quantidade mensurável de NO em solução. Portanto, este processo forneceu uma estimativa experimental da quantidade de NO gerada baseando-se na molaridade de uma solução padrão de SNAP frente a um conjunto de parâmetros controlados. Dessa forma, o SNAP reagiu com o CuCl_2 produzindo o gás NO. Quando o sensor detectou esse gás, gerou uma corrente que foi medida e expressa na forma de um gráfico (**Figura 7**).

Reação de decomposição do SNAP



Além disso, realizamos a identificação e viabilidade das células endoteliais isoladas utilizando a citometria de fluxo, pois este método fornece uma análise rápida das características múltiplas de células individuais. A informação obtida é tanto quantitativa como qualitativa. O princípio da técnica se baseia na marcação de células utilizando anticorpos específicos corados que ao passar pela fonte de luz, essas moléculas são excitadas para um estado de alta energia e emitem uma fluorescência a qual é detectada pelo equipamento. Dessa forma, para excluirmos a interferência das células mortas foi utilizado o 7-AADD que é um marcado de células que estão viáveis para o experimento, sendo 90% das células presentes na amostra da suspensão com células endoteliais (CEs) aptas para a medida de NO. Além deste anticorpo, as células foram marcadas pelo CD31^+ para a identificação das CEs, pois ele se liga a receptores específicos na membrana dessas células, o que confirma sua presença na suspensão que foi de 79%. Isso porque o óxido nítrico (NO) liberado nos vasos sanguíneos é produzidos pela eNOS que é a enzima responsável pela síntese do óxido nítrico endotelial. Esta enzima oxida um resíduo de L-citrulina para formar L-arginina e NO, este último se difunde para as células musculares adjacentes causando relaxamento. Por isso, é imprescindível a identificação das CEs na suspensão visto que o componente avaliado neste estudo tem sua produção dependente dessas células.

Assim, com os sensores específicos de NO aptos para uso e as CEs já identificadas, foram realizados os experimentos bioquímicos que mostraram a produção do NO pelo STP (10 a $100\mu\text{M}$). Os resultados mostraram um aumento significativo na concentração deste composto após a adição cumulativa de STP em suspensão de células endoteliais isoladas de ratos.

O NO age nas células do músculo liso vascular pela ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs), sendo este o mecanismo primário pelo qual o NO induz relaxamento e, portanto, tem grande importância na terapia farmacológica de doenças cardiovasculares (EVORA et al., 2012). Esta ação leva a um aumento na concentração de GMPc com subsequente ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e outros efetores moleculares que podem mediar o efeito relaxante dependente de GMPc nas células musculares lisas vasculares (VSMCs) (DERBYSHIRE; MARLETTA, 2012; HOENICKA; SCHMID, 2008; WALTER, 1989).

Além disso, estudos prévios tem demonstrado a participação da via NO/CGs/GMPc no efeito vasorrelaxante do STP. Foi observado que na presença da hidroxicobalamina (HDX), seqüestrador de NO radicalar, e do ODQ, inibidor da CGs, houve uma atenuação no efeito relaxante produzido pelo STP (VERAS, 2005). Portanto, essa medida de NO vem a corroborar com estes resultados obtidos anteriormente.

6. Conclusão

Assim, conclui-se que esta técnica de medida de NO por amperometria permite detectar quantidades pequenas desta molécula em solução sendo útil em preparações de células isoladas, além da capacidade de avaliar a produção local de óxido nítrico, facilitando a exploração do papel deste mediador em processos fisiológicos ou fisiopatológicos.

7. Referências

AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, 2002.

ARAÚJO, D. A. M. et al. N-salicyloyltryptamine, a new anticonvulsant drug, acts on voltage-dependent Na⁺, Ca⁺⁺ and K⁺ ion channels. **Br. J. Pharm.**, v. 000, n. 0, p. 1-9, 2003.

ARNAL, J. et al. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertens.**, v. 22, p. 380–387, 1993.

BAUER, J. A.; FUNG, H. L. Arterial versus venous metabolism of nitroglycerin to nitric oxide: a possible explanation of organic nitrate venoselectivity. **J. Cardio. Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 371-374, 1996.

BONAVENTURA, D. et al. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 387-394, 2006.

BREISBLATT, W. M. et al. Usefulness os serial radionucleotide monitoring during graded nitroglycerin infusion for unstable angina pectoris for determination left ventricular function and individualized therapeutical dose. **Am. J. Cardiol.**, n. 61, p. 685-690, 1988.

BRODY, J. R. et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. **Cell Cycle**, v. 8, n. 12, p. 1930-1934, 2009.

BULCÃO, R. et al. Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 149-158, 2012.

COHN, J. N. The Management of Chronic Heart Failure. **N. Engl. J. Med**, v. 4, n. 336, p. 490-498, 1996.

COIMBRA, J. B. **Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais**. 2012. Universidade de São Paulo

COWLEY, A. W. The genetic dissection of essential hypertension. **Natures reviews genetics**, v. 7, p. 829-840, 2006.

DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. **Annu Rev Biochem**, v. 81, p. 533-59, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002. ISBN 0471496413.

DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION , D. O. J. Schedules of controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-N, N-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. **Federal register**, v. 68, n. 65, p. 16427, 2003.

DUNCAN, B. B. Risk factors for non-communicable diseases in a metropolitan area in the south of Brazil. Prevalence and simultaneity. **Rev Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 43-48, 1993.

EVORA, P. R. et al. Cardiovascular therapeutics targets on the NO-sGC-cGMP signaling pathway: a critical overview. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 1207-14, Aug 2012.

FEELISCH, M.; STAMLER, J. **Methods in nitric oxide research**. Wiley-Blackwell, 1996. ISBN 0471955248.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: no longer an f-word! **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 91-92, 2013.

FERRONI, P. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 16, n. 3, p. 222-233, 2006.

FONTANILLA, D. et al. The hallucinogen N, N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. **Science**, v. 323, n. 5916, p. 934-937, 2009.

FUCHS, F. D. Hipertensão Arterial sistêmica. Epidemiologia e prevenção. **Arq. Bras Cardiol**, v. 63, p. 443-444, 1994.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597-601, Jun 10 1999.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. THE OBLIGATORY ROLE OF ENDOTHELIAL-CELLS IN THE RELAXATION OF ARTERIAL SMOOTH-MUSCLE BY ACETYLCHOLINE. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980 1980.

GADI, D. et al. Parsley extract inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 170-174, 8/17/ 2009.

GARTHWAITE, J. et al. POTENT AND SELECTIVE-INHIBITION OF NITRIC OXIDE-SENSITIVE GUANYLYL CYCLASE BY 1H- 1,2,4 OXADIAZOLO 4,3-A QUINOXALIN-1-ONE. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, Aug 1995.

GASPAROTTO, J. et al. Effect of N-salicyloyltryptamine (STP), a novel tryptamine analogue, on parameters of cell viability, oxidative stress, and immunomodulation in RAW 264.7 macrophages. **Cell Biol Toxicol**, v. 29, n. 3, p. 175-87, Jun 2013.

GAZIANO, T. A. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. **Circulation**, v. 112, p. 3547-3553, 2005.

GUTIERREZ, S. J. C. **Preparação de novos derivados benzoiltryptamínicos com potencial atividade biológica**. 2001. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa PB.

HALBERSTADT, A. L.; GEYER, M. A. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 364-381, 2011.

HIFNAWY, M. S. et al. Produits neutres et alcaloïdes de *Myrtopsis macrocarpa*, *M. myrtoidea*, *M. novae-caledoniae* et *M. selligii*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 7, p. 1035-1039, 1977.

HOENICKA, M.; SCHMID, C. Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 6, n. 4, p. 287-301, Oct 2008.

IGNARRO, L. et al. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange: comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 4997-5002, 1986.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

JONES, R. Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain? **Progress in neurobiology**, v. 19, n. 1, p. 117-139, 1982.

LIMA, J. C. C.; MOREIRA, A.; SODRÉ, F. L. Uma nova abordagem bioquímica no diagnóstico das síndromes coronarianas agudas (Infarto agudo do miocárdio). **NewsLab**, n. 33, p. 142-152, 1999.

MALINSKI, T.; TAHA, Z. NITRIC-OXIDE RELEASE FROM A SINGLE CELL MEASURED INSITU BY A PORPHYRINIC-BASED MICROSENSOR. **Nature**, v. 358, n. 6388, p. 676-678, Aug 20 1992.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric Oxide Synthases: which, where, how, and why? **J. Clin. Invest.**, n. 100, p. 2146-2152, 1997.

MONCADA, S. et al. THE L-ARGININE - NITRIC-OXIDE PATHWAY. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, p. S1-S9, 1991 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

NING, H. et al. Effects of High Glucose on Human Cavernous Endothelial Cells. **Urology**, v. 80, n. 5, p. 1162.e7-1162.e11, 2012.

OLIVEIRA, F. A. **Estudo Químico e Efeitos Psicofarmacológicos de Substâncias Indólicas**. 1997. 149 Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, João Pessoa.

OLIVEIRA, F. A. et al. Anticonvulsivant properties of N-salicyloyltryptamine. **Pharmacol. Bioch. Behavior**, v. 68, p. 199-202, 2001.

OLMOS, R. D.; LOTUFO, P. A. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil e no mundo. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, n. 1, p. 21-3, 2002.

PEACH, M. J. et al. Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle. **The American journal of cardiology**, v. 59, n. 2, p. A35-A43, 1987.

PECHÁNOVÁ, O. et al. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. **J. Hypertension**, v. 22, p. 167-173, 2004.

PSATY, B. M. et al. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. **Jama**, v. 289, n. 19, p. 2534-2544, 2003.

QUINTANS, L. J., JR. et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive effect of N-salicyloyltryptamine: a behavioral and electrophysiological approach. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 230745, 2010.

RAFIKOV, R. et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **Journal of Endocrinology**, v. 210, n. 3, p. 271-284, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Rang And Dale - Farmacologia**. Brasil: Campus, 2012. 808

RIBEIRO, T. P. et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 811-816, Aug 2010.

ROBINSON, J. K.; BOLLINGER, M. J.; BIRKS, J. W. Luminol/H₂O₂ chemiluminescence detector for the analysis of nitric oxide in exhaled breath. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 22, p. 5131-5136, 1999.

ROY, B.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited. **PNAS**, v. 103, n. 32, p. 12185-12190, 2006.

SERPE, M.; ZHANG, X. The principles, development and application of microelectrodes for the in vivo determination of nitric oxide. 2007.

SHIBUKI, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. **Neuroscience research**, v. 9, n. 1, p. 69-76, 1990.

TAYLOR, J. G.; BISOGNANO, J. D. Baroreflex stimulation in antihypertensive treatment. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 3, p. 176-181, 2010.

TRAPANI, G. et al. Synthesis and Anticonvulsant Activity of some 1,2,3,3a - Tetrahydropyrrolo [2,1-b]- benzothiazol-, -thiazol- or oxazol-1- ones in Rodents. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 834-840, 1996.

TSUKAHARA, H.; GORDIENKO, D.; GOLIGORSKY, M. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 193, n. 2, p. 722-729, 1993.

VAN BEIJNUM, J. R. et al. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1085-1091, 2008a.

_____. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1085-1091, 2008 2008b.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 4, p. 595-601, 2009.

VERAS, R. C. **Estudo do Efeito Vasorelaxante de N-saliciloiltriptamina em Artéria Mesentérica Superior Isolada de Rato**. 2005. 64 Dissertação (Mestrado em Farmacologia). LTF, UFPB, João Pessoa.

WALTER, U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**, v. 113, p. 41-88, 1989.

ZICHA, J.; DOBESŔOVA', Z.; KUNESŔ, J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. **J Hypertens**, v. 19, p. 247-254., 2001.

